

)

Ortopédiai sebfertőzések mikrobiológiai nyomon követése

PhD értekezés tézisei

Dr. Kustos Tamás

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Nagy Judit

Programvezető:

Prof. Dr. Bellyei Árpád

Témavezetők:

Dr. Kocsis Béla

Prof. Dr. Kilár Ferenc

**Pécsi Tudományegyetem Orvos Egészségügyi Centrum
Általános Orvostudományi Kar
Ortopédiai Klinika**

2003

Bevezetés

A sebfertőzések az ortopédiai műtétek egyik legrettegettebb szövődményei, melyek mind a beteget, mind az operáló orvost, de az ellátó intézményt is rendkívül súlyosan érinthetik. A sebfertőzések kezelése rendkívül nehéz és hosszadalmas, költség vonzata miatt súlyos terheket ró az ellátó intézményre is. Ezek alapján a fertőzések megelőzése minden ortopédiai osztály kiemelkedő feladata. Ha azonban a fertőzés bekövetkezik, a korai diagnózis felállítása, a megfelelő terápia időben történő megkezdése rendkívül fontos, mert így van esély a fertőzés szanálására, nagyizületi endoprotézis beültetését követően esetlegesen a protézis „megmentésére”, ami sok szenvedéstől kímélheti meg a beteget. Sebfertőzések esetén azonban a korai diagnózis felállítása nem egyszerű feladat, lévén, hogy fizikálisan az operált terület fájdalmas, néha duzzadt lehet úgymond „normál” esetben is. A betegnek lehet hőemelkedése, láza a műtéti haematomák felszívódása miatt is. Képzalkodó eljárások (RTG, UH, scintigraphia) általában nem informatívak, MRI vizsgálat pedig gyakran nem végezhető (pl. protézis beültetéseket követően sem) a beültetett fémanyagok miatt. A nehezen megítélhető fizikális jelek mellett így a labor vizsgálat adhat támpontot a sebésznek, melyhez azonban ismerni kell azt, hogy „normál”, nem infekt esetekben hogy változnak a gyulladásos paraméterek a műtéteket követően. Ha pedig sikerült felállítanunk a diagnózist, a megfelelő terápia mielőbbi megkezdése a cél. Ehhez viszont ismernünk kell az általunk kezelt fertőzés kórokozóját, annak tulajdonságait, az átlagtól való eltérését. A fentiek alapján fogalmaztuk meg kutatásunk céljait és végeztük kísérleteinket.

A baktériumok sejt felszíni hidrofobicitása

A bakteriális infekció egy több fázisból álló folyamat. A baktériumok megtapadása a gazdasejtek felszínén a fertőzési folyamat első szignifikáns lépése, melyet kolonizáció, bakteriális szaporodás, invázió és szövet destrukció követ.

Az adhézió első, rapid fázisa számos nem specifikus, relatíve gyenge fiziko-kémiai kölcsönhatáson alapul. Ezek közül az egyik legfontosabbnak tartott a hidrofób interakció. Emellett elektrosztatikus erők, hidrogén kötések, van der Waals erők, és lektin szerű interakciók is szerepet játszanak a fertőzés ezen fázisában. Ezen kölcsönhatások eredménye a patogének azonnali, reverzibilis kötődése a gazdasejt felszínéhez.

Számos bakteriális és fungális patogén elsősorban a hidrofób kölcsönhatások révén kolonizálja a gazdaszervezet szöveteit. A baktériumok felszínén általában hidrofób és hidrophil komponensek is kifejeződnek, és számos molekula járul hozzá a sejt felszíni hidrofobicitás kialakításához. Néhány ezek közül kovalensen kötődik a sejtfalhoz (pl. *Staphylococcus* és

Streptococcus proteinek), vagy a citoplazma membránhoz (pl. *Streptococcus pyogenes* lipoteikolsav). Egyesek a külső membránba vannak lehorgonyozva (pl. fimbriális fehérjék), de lehetnek szekretált biomolekulák is (pl. *Acinetobacter calcoaceticus* amphiphil poliszacharidja).

A nem specifikus hidrofób kölcsönhatások adhézióban betöltött szerepe számos vizsgálati módszer kifejlesztéséhez vezetett. Munkánk során ezek közül a só aggregációs tesztet (SAT) és a mikrobák szénhidrogénekhez való adhézióját (MATH) alkalmaztuk. Emellett több más módszer (pl. hidrofób interakciós kromatográfia, két fázisú megoszlási módszer stb.) is használatosak.

A hidrofobicitási vizsgálatok jelentőségét az adja, hogy a baktériumok hidrofób karaktere a virulenciával, a megbetegítő képességgel asszociált. Erre számos példa található az irodalomban: pl. a *Yersinia enterocolitica* plazmid által kódolt sejt felszíni proteinje hidrofób tulajdonságot biztosít a mikrobának. Az infektiiv hidrofób törzsek hordozzák a plazmidot, míg a plazmid hiányos mutánsok felszíne hidrofílebbé válik, és elvesztik megbetegítő képességüket. A pyelonephritist okozó P fimbriáival rendelkező *E. coli* törzsek is hidrofób sejt felszínnel jellemezhetőek. A *S. aureus* törzsek adhezinjei, amelyek extracelluláris mátrix fehérjékhez (pl. kollagén, fibronectin, laminin) képesek kötődni, elsősorban hidrofób aminosavakat tartalmazó aktív kötőhelyekkel rendelkeznek. A baktériumok adhéziós képessége mind az élő szövetekhez, mind az orvosi implantátumok felszínéhez növekszik kifejezettebb hidrofobicitás esetén, és csökken hidrofílebb mikrobiális felszín esetén.

Külső membrán fehérjék

Az adhézió első, rapid fázisát a lazán tapadt baktérium sejtek permanens kötődése követi az élő sejtek vagy implantátumok felszínéhez. Ez a folyamat már specifikus interakciókon alapul, mely a bakteriális adhezinek és a gazdasejt receptorai között alakul ki. Számos, a baktérium felszínén expresszálandó komponens vehet részt az infekció ezen fázisában, pl. fimbriális fehérjék, nem fimbriális adhezinek, lipopoliszacharidok, külső membrán fehérjék (OMP), stb. Ezen faktorok közül tanulmányunkban mi a külső membrán fehérje összetételét elemeztük részleteiben.

Az OMP-k a Gram-negatív baktériumok külső membránjában helyezkednek el. Egyes proteinek nagy mennyiségben vannak jelen, ezek az ún. major fehérjék. Az OMP-k számos bakteriális funkcióban töltenek be fontos szerepet. A legismertebb külső membrán fehérjék a porinok, melyek a baktériumok sejtfalában pórusokat hoznak létre, és lehetővé teszik számos

anyag transzportját a külső membránon keresztül. A porinok egyik csoportja nem specifikus csatornákat képez, amely a kis molekulásúlyú hidrofil molekulák átjutását biztosítja. A bélbaktériumok porinjai, és az ortopédiai mintáinkból is izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzsek porinjai jelentősen különböznek egymástól. A *Pseudomonas* külső membrán proteinjei szignifikánsan nagyobb pórusokat képeznek, és nagyobb molekula tömegű hidrofil molekulák (6000 Da-ig) transzportját teszik lehetővé. Ugyanakkor ezek a pórusok sokkal gyakrabban vannak zárt állapotban, mint bélbaktériumok esetén, így általában a diffúzióhoz rendelkezésre álló pórusok mennyisége jelentősen kevesebb a *Pseudomonas* törzsekben. Ez az alacsony külső membrán permeabilitás magyarázza a *Pseudomonas* törzsek nagyfokú természetes rezisztenciáját hidrofil antibiotikumokkal szemben. A porinok másik csoportja specifikus diffúziós folyamatokban játszik szerepet pl. LamB protein a maltóz és maltodextrinek, a Tsx a nukleozidok, a BtuB a B12 vitamin transzportjában.

További funkciója az OMP-knek, hogy receptorként szolgálnak számos bakteriofág (T6, T5, T1, λ) és colicin (colicin B, D, E, K) számára. Mint sejt felszíni antigének részt vesznek a gazdaszervezet immun válaszában kiváltásában. Ezenkívül fontos pathogenetikai faktorok, a baktériumok adhéziójában, megtapadásában játszanak szerepet.

Biofilm képződés

A modern egészségügy számos területén egyre növekvő számban alkalmaznak beültethető orvosi eszközöket (pl. protézisek, katéterek, tubusok), amelyet egyre növekvő incidenciájú implantátum asszociált fertőzés kísér.

A mikroorganizmusok megtapadása az élő sejtek és a beültethető orvosi eszközök felszínén hasonló módon játszódik le, de hangsúlyozni kell, hogy a baktériumok nagyobb adhéziós hajlamot mutatnak az élettelen mesterséges felületek iránt. Az adhéziót az implantátum felületén kolonizáció és biofilm képződés követi, amelyet direkt elektron mikroszkópos vizsgálatokkal demonstrálni lehet. A biofilm képzés folyamata alatt a baktérium sejtek egy exopoliszacharid glucocalix mátrixot termelnek, és ebben szaporodnak a baktériumok. Scanning konfokális mikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján a legtöbb bakteriális species által termelt biofilmnek hasonló az összetétele, biokémiaiag uronsavakból, mono- és diszacharidokból (pl. mannóz, fukóz, aminocukrok) állnak. Számos patogén és szaprofita baktérium képezhet biofilmet, de vannak olyan speciesek, melyek hajlamosabbak mátrix termelésre és biofilm képzésre a legkülönbözőbb felületeken, pl.: *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*. A biofilmen belüli életfolyamatokat részletesen tanulmányozták az elmúlt évtizedben. A

biofilmen belül speciális, nehezen reprodukálható körülmények találhatók. Az oxigén diffúziója, a tápanyagok transzportja, és a metabolikus végtermékek eltávolítása különbözik a biofilm egyes részei között. Az anyagcsere folyamatok lelassultak, a baktériumok szaporodási rátája kifejezetten alacsony. A biofilm képzés egyik igen fontos klinikai jelentősége, hogy az exopoliszacharid mátrix védelmet biztosít a benne szaporodó baktériumoknak az antibiotikumokkal, enzimekkel, biocidekkel, és a szervezet immun rendszerével szemben. Irodalmi adatok alapján a biofilmként növekvő baktériumok antibiotikumokkal (streptomycin, chloramphenicol) szembeni rezisztenciája 25-32-szeres, biocidekkel (pl. ezüst nitrát, nátrium hipoklorid) szembeni ellenálló képessége pedig 10-16-szoros emelkedést mutatott. Ez magyarázza az implantátum asszociált fertőzések igen rezisztens jellegét, gyakori krónikussá válását, amely igen gyakran reoperációt és a protézisek eltávolítását követeli meg. További klinikai problémák adódhatnak a biofilm felszínéről leváló, ún. planktonikus fázisba jutó baktérium sejtekből, melyek a szervezet különböző pontjaira eljutva újabb felszínekhez tapadhatnak, és súlyos klinikai tüneteket (pl. sepsis) válthatnak ki. Ezek a tények támasztják alá a biofilm vizsgálatának jelentőségét az ortopédiában, ahol a nagy ízületi felszíneken a kórokozók biofilmeket létrehozva súlyos klinikai tüneteket válthatnak ki.

Számos kísérleti protokoll létezik az orvosi implantátumok bakteriális kolonizációjának vizsgálatára pl. direkt mikroszkópos vizsgálatok, radioizotópos technikák, a biofilm festési módszerekkel történő detektálása, biológiai próbák, és az implantátum felületéről eltávolított élő baktérium csíraszám meghatározása. Mi vizsgálataink során ez utóbbi csoportba tartozó ultrahangos módszert alkalmaztuk. Az ilyen módon kapott eredmények kvantitatívak, direktek, könnyen standardizálhatók, és nem igényelnek speciális felszereltséget. Különböző, komplex formájú objektumok esetén is alkalmazható, mindezen előnyei következtében széles körben alkalmazzák a kísérletekben.

Az antibiotikus hatás vizsgálata

Az antibiotikus kezelés számos morfológiai és metabolikus változást képes előidézni a baktérium sejtekben, pl. a bakteriális adherencia változásai, a sejtek ultra struktúrájának, a fehérje és/vagy DNS szintézisének változásai, az enzimtermelés, vagy bakteriális virulencia faktorok szintézisének változásai.

Az antimikrobiális szerek képesek módosítani a sejt felszíni fizikokémiai tulajdonságokat. Irodalmi adatok alapján az antibiotikus kezelés képes csökkenteni a sejt felszíni hidrofobicitást. Ezen változások jelentősége, hogy a hidrofílebb sejt felszínnel rendelkező mikrobák csökkent adhéziós képességgel rendelkeznek.

Szintén több irodalmi adat utal a külső membrán fehérje összetétel antibiotikus hatás alatti változásaira. Egyes fehérjék nagyobb mennyiségben fejeződnek ki, míg mások termelése csökken az antibiotikum adagolás következtében. Ezen eredmények jelentősége, hogy az OMP profilban bekövetkező változások a patogének sejt felszíni változásai következtében módosíthatják az adhézis képességet, amelynek kihatása lehet a baktérium törzsek virulenciájára, megbetegítő képességére.

Az alkalmazott antibiotikumok koncentrációja igen nagy mértékben befolyásolhatja a bakteriális morfológiában és funkcióban indukált változásokat. Ezért kísérleteinkben sub-inhibitorikus ($0.5 \times \text{MIC}$) és supra-inhibitorikus ($2 \times \text{MIC}$) koncentráció szinteket is alkalmaztunk.

Az antibiotikumok minimális gátló koncentrációját (MIC) csőhígítási módszerrel határoztuk meg: minden cső 1-1 ml buillont tartalmazott, majd az antibiotikum törzsoldattal ($800 \mu\text{g/ml}$) felező hígítást végeztünk. Ezután a baktérium szuszpenzióból (abszorbanciája 600 nm-en 0.2 volt) 10-10 μl -t adtunk minden csőhöz, és inkubáltuk 37°C -on 24 órán át. Az a legkisebb antibiotikum koncentráció, amely 24 órás inkubáció után képes volt gátolni a bakteriális növekedést, felelt meg a MIC értéknek.

Célkitűzések

1. Három, infekció esetén gyakran használt labor paraméter (vörösvérsejt süllyedés /We/, fehérvérsejtszám /Fvs/, C-reaktív protein /CRP/) postoperatív értékeinek meghatározása, olyan esetekben amikor nagyizületi endoprotézis (csípő- és térd total endoprotézis) beültetést követően sebfertőzés nem következett be. A „normál” értékek ismerete segítséget nyújthat infekt esetek korai diagnosztizálásában.
2. Ortopédiai sebfertőzések esetén a kórokozó baktériumok tenyésztése a sebváladékból, és identifikálása mikrobiológiai módszerekkel.
3. A kitenyésztett *S. aureus*, koaguláz-negatív *Staphylococcus*, és *P. aeruginosa* törzsek antibiotikum érzékenysége és a minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása 4 antibiotikum esetében (cefuroxim, cefotaxim, amoxicillin + klavulán sav, amikacin). Ezek a leggyakrabban használt antibiotikumok klinikánk gyakorlatában az antibiotikus profilaxis és terápia terén.
4. A kitenyésztett baktériumok sejtfelszíni hidrofobicitásának meghatározása és ezek összehasonlítása 3 standard magyar baktérium törzs sejtfelszíni hidrofobicitásával. A hidrofobicitás meghatározását két különböző teszttel, a kisózásos módszerrel (Salt Aggregation Test – SAT) és a szerves oldószerekben való megoszlás alapján (Microbial Adhesion To Hydrocarbon - MATH) kívántuk vizsgálni és a két teszttel kapott eredményeket összehasonlítani.
5. Vizsgálni kívántuk a fent említett 4 antibiotikum sub-inhítorikus és supra inhítorikus koncentrációinak hatását a sejtfelszíni hidrofobicitásra.
6. Analizálni kívántuk az ortopédiai mintákból izolált *P. aeruginosa* törzsek külső membrán fehérjeit egy új módszerrel, a kapilláris elektroforézissel. Össze kívántuk hasonlítani ezen profilokat egy standard törzs vizsgálata esetén kapott elektroferogrammal, valamint meg kívántuk határozni ezen technikával a supra-inhítorikus koncentrációban alkalmazott antibiotikumok külső membrán fehérjékre kifejtett módosító hatását.
7. Meg kívántuk vizsgálni ultrahangos módszerrel a kitenyésztett baktériumok megtapadási képességét polyethylén acetábulumon, illetve azt, hogy a fent említett 4 antibiotikum sub-inhítorikus és supra-inhítorikus koncentrációja módosítja-e a megtapadási képességet.
8. Meg kívántuk vizsgálni, hogy az ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek sejtfelszíni hidrofobicitása, a külső membrán fehérjék összetétele és a megtapadási képességük összefüggésben van-e.
9. A klinikai gyakorlatra vonatkozó javaslatok megfogalmazása vizsgálataink eredményeinek ismeretében.

1. Labor paraméterek változása totál endoprotézisek beültetését követően nem fertőzött esetekben

1.1 Beteganyag és módszer

Vizsgálatainkhoz 50 olyan beteget választottunk, akik a PTE OEC Ortopédiai Klinikáján totál endoprotézis beültetésen estek át. Betegeinknél vizsgáltuk a fertőzések esetén rendszeresen nézett labor paraméterek közül a We, Fvs és CRP értékeket.

A kiválasztás random módon történt, de csak azon betegek kerültek a tanulmányba, akik:

1. Nem szenvedtek olyan ismert betegségben, ami befolyásolhatta volna a fent említett labor paramétereket, mint pl. diabetes mellitus, köszvény, rheumatoid arthritis, stb.
2. A vizsgált betegek nem estek át korábban totál endoprotézis beültetésen vagy más nagyobb ortopédiai műtéteken akár fém anyag beültetéssel, akár anélkül.
3. Felvételtkor a betegek vér süllyedés értéke normál tartományon belül volt ($We < 20$ mm/h).
4. A tanulmányba bekerült betegek negatív torok és vizelet leoltási eredménnyel rendelkeztek.

A betegeknél vizsgáltuk a fent említett labor paramétereket a műtét előtt, majd az 1., 3. és 10. posztoperatív napokon. Betegeinknél 45 esetben végeztünk totál csípő és 5 esetben totál térdízületi endoprotézis beültetést.

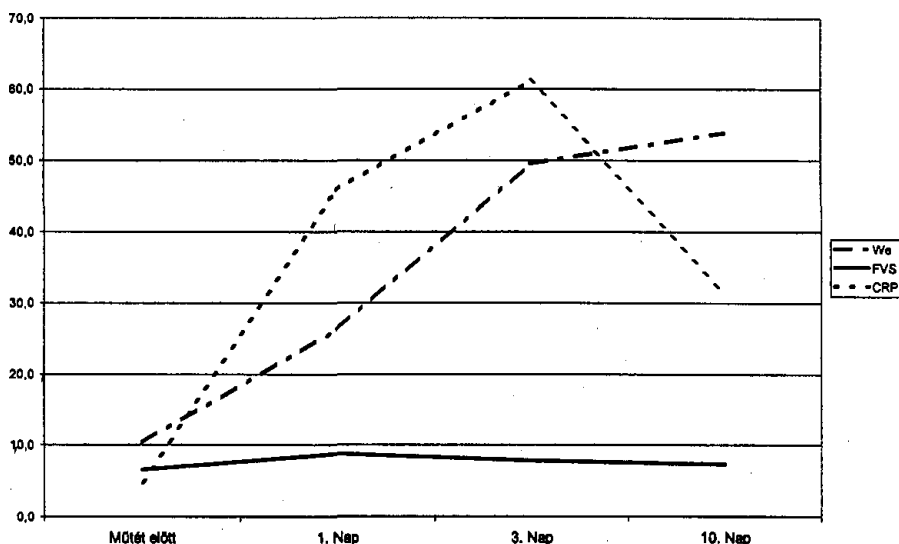
1.2. Eredmények

Az 50 vizsgált betegünk közül egy adatait ki kellett zárunk a tanulmányból, mert a betegnél sebfertőzés lépett fel totál csípőízületi endoprotézis beültetést követően.

A labor paraméterek posztoperatív változását az 1. ábrán szemléltetném.

Jól látszik az ábráról, hogy a fehérvérsejt szám a vizsgált periódus alatt praktikusán változatlan értékeket mutatott. Ezzel szemben a vérsüllyedés érték előbb kissé gyorsabb, majd lassabb, de folyamatos emelkedésen esett át a vizsgált periódusban. A C-reaktív protein érték viszont a 3. posztoperatív naptól kezdve átmeneti emelkedést követően csökkenő tendenciát mutatott. Ezek alapján mondhatjuk, hogy a totál endoprotézis beültetéseket követően a korai fertőzések diagnosztizálásában a sebésznek a legjobb támpontot a CRP érték adhatja, hiszen fertőzés fennállásakor a CRP érték nem csökken. Ezt támasztotta alá az az esetünk is, ahol fertőzés következett be totál csípőízületi endoprotézis beültetést követően és a CRP érték a 10. posztoperatív napon sem csökkent, sőt további emelkedést mutatott.

1. ábra A We, Fvs és CRP átlag értékeinek alakulása 49 beteg alapján, műtét előtt és után totál endoprotézis beültetése során nem fertőzött esetekben.



2. Bakteriális sejt felszíni hidrofobicitás vizsgálata kisózással (SAT)

2.1. Anyag és módszer

Kísérleti sorozatunk második részében olyan betegeket vizsgáltunk, akikben ortopédiai műtétet követően bakteriológiai úton igazolható seb infekció alakult ki. Hét betegből, akik életkora 14 és 87 év között volt, 13 baktérium törzset izoláltunk, és identifikáltunk mikrobiológiai módszerekkel: 5 *S. aureus*, 3 koaguláz-negatív *Staphylococcus* és 5 *P. aeruginosa* törzset. A klinikai izolátumok mellett - kontrollként - három magyar standard törzset is vizsgáltunk: *S. aureus* NIH Hungary 118003, *S. saprophyticus* NIH Hungary 120008, és *P. aeruginosa* NIH Hungary 170000.

Ebben a kísérlet sorozatunkban az ortopédiai mintákból izolált baktériumok sejt felszíni hidrofobicitását kívántuk meghatározni a kisózással, és össze akartuk hasonlítani a klinikai izolátumok és a három standard törzs hidrofobicitási értékeit. Ezenkívül elemeztük, hogy az antibiotikus hatás képes-e változásokat indukálni a baktériumokra jellemző hidrofobicitási karakterben. A só aggregációs tesztben 10 µL kezeletlen vagy antibiotikummal kezelt baktérium szuszpenziót (5×10^9 baktérium / mL) - 0.04 M nátrium foszfát pufferben (pH = 6.8) - kevertünk össze tárgylemezen 10-10 µL növekvő

koncentrációjú ammónium szulfát oldatokkal (0.05 – 4.00 M / L). A baktériumok sejt felszíni hidrofobicitását azzal a legalacsonyabb ammónium szulfát koncentrációval jellemezzük, amely már képes volt bakteriális aggregációt előidézni. A négy antibiotikum hatását sub-inhibitorikus és supra-inhibitorikus koncentrációban elemeztük: a baktérium tenyészetet 60 percig inkubáltuk antibiotikum jelenlétében, majd a só aggregációs tesztet ugyanúgy végeztük el, mint a kezeletlen esetekben.

2.2. Eredmények

A kezeletlen *S. aureus*, koaguláz-negatív *Staphylococcus* és *P. aeruginosa* törzsek aggregációja 1.00 - 3.00 M/L koncentrációjú ammónium szulfát jelenlétében volt látható. A kiszószás módszerrel nem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget a klinikai izolátumok és a magyar standard koaguláz-negatív *Staphylococcus* (2.5 M/L), *S. aureus* (2.0 M/L) és *P. aeruginosa* (2.0 M/L) törzsek hidrofobicitása között.

Mind a standard törzseket, mind az ortopédiai izolátumokat 0.5 x MIC és 2 x MIC koncentrációjú cefuroxim, cefotaxim, klavulánsavval kombinált amoxicillin és amikacin kezelésnek tettük ki. Eredményeink alapján az antibiotikus kezelés számos esetben képes volt a sejt felszíni hidrofobicitás megváltoztatására. Ezen változások minden esetben azt jelentették, hogy a látható sejt aggregáció magasabb ammónium szulfát koncentráció mellett következett be, tehát a hidrofobicitás csökkent. Statisztikai analízis (egy mintás egy oldalas Z-próba) alapján a detektált változások több mint 39 %-a szignifikáns volt ($p < 0.001$). Hangsúlyozni szeretnénk, hogy habár nem az összes módosítás volt szignifikáns, amelyet antibiotikum jelenlétében ki tudtunk mutatni, de a változások tendenciája minden esetben ugyanaz volt: azaz a bakteriális sejt felszín hidrofílebbé vált, hidrofobicitása csökkent.

Ezenkívül ki szeretnénk emelni, hogy a supra-inhibitorikus (2 x MIC) koncentrációjú antibiotikum kezelés gyakoribb és nagyobb mértékű hidrofobicitás változás előidézésére volt képes, mint a sub-inhibitorikus koncentráció.

3. Baktériumok sejt felszíni hidrofobicitásának meghatározása szénhidrogénekhez történő adhézió alapján

3.1. Anyag és módszer

Következő kísérleteinkben a korábbiakban említett ortopédiai izolátumok és a három standard törzs sejt felszíni hidrofobicitását kívántuk elemezni a szénhidrogénekhez való adhéziójuk alapján. Ezzel a módszerrel is analizáltuk a négy különböző antibiotikum sub-MIC és supra-MIC koncentrációinak sejt felszíni hidrofobicitásra kifejtett hatását. Továbbiakban pedig összehasonlítottuk a két különböző, bakteriális hidrofobicitás meghatározására használt módszerrel kapott eredményeket.

A baktériumok sejt felszíni hidrofobicitásának vizsgálatára 1983-ban Rosenberg és mtsai vezették be a MATH módszert (mikrobiális adhézió szénhidrogénekhez). Ezen metodika lényege, hogy a vizes szuszpenzióban található baktériumokat (optikai denzitás 600 nm-en 0.4 és 0.6 között) szénhidrogénekkel keverjük össze, és a hidrofób felszínnel rendelkező sejtek hajlamosabbak a szénhidrogénekhez való kötődésre. Vizsgálatainkban három különböző szerves oldószert, hexadecane-t, toluene-t és xylene-t alkalmaztunk. Egy perces Vortex-szel végzett rázást követően a keveréket öt percig nyugalomba helyezve a hidrofób szolvens és a vizes fázis élesen elkülönült egymástól. A vizes fázist eltávolítva 600 nm-en határoztuk meg az abszorbanciát. A hidrofobicitás %-os értékének meghatározását a következő egyenlet alapján végeztük:

$$\text{hidrofobicitás \%} = \left[\frac{OD_{\text{előtte}} - OD_{\text{utána}}}{OD_{\text{előtte}}} \right] \times 100$$

Az antibiotikus hatás elemzésére a 4 különböző típusú antibiotikumot használtuk fel 0.5 x MIC és 2 x MIC koncentrációban. Az antibiotikus kezelés időtartama 60 perc volt.

3.2 Eredmények

A MATH módszerrel a három standard törzs és hat klinikai izolátum (KT 1, KT 25 Sta., KT 24, KT 278, KT 2, és KT 25 Ps.) sejt felszíni hidrofobicitását elemeztük. A legmagasabb hidrofobicitási értékeket a *S. aureus* törzsek esetében tudtuk detektálni, szignifikánsan alacsonyabb értékkel jellemezhetőek a koaguláz-negatív *Staphylococcusok*, és a legalacsonyabb értékeket a *P. aeruginosa* törzseknél találtuk. Statisztikai kiértékelés (ANOVA teszt = analysis of variance) alapján a három bakteriális species hidrofobicitási értékei szignifikáns különbséget mutattak ($F = 127.54$; $p < 0.001$). A *S. aureus* és a *P. aeruginosa* speciesen belül nem tudtunk szignifikáns különbséget demonstrálni a standard törzsek és az ortopédiai izolátumok hidrofobicitási jellemzői között. Ugyanakkor a koaguláz-negatív KT 278 törzs hidrofobicitási karaktere és a standard *S. saprophyticus* NIH Hungary 120008 értéke szignifikáns eltérést mutatott. Ezt a jelenséget feltehetőleg azzal a ténnyel lehet

magyarázni, hogy a standard törzstől eltérően a KT 278 törzs biokémiai vizsgálatok alapján koaguláz-negatív *S. hominis* speciesnek bizonyult.

Vizsgálataink során három különböző oldószert alkalmaztunk (1. anyag és módszer fejezet). A statisztikai vizsgálatok alapján nem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni a három különböző oldószert jelenlétében kapott hidrofobicitási értékek között. ($F= 1.026$; $p= 0.437$).

A négy különböző antibiotikum (cefuroxim, cefotaxim, klavulánsavval kombinált amoxicillin és amikacin) hatását a sejt felszíni hidrofobicitásra szintén analizáltuk a MATH módszer felhasználásával. Habár számos változást tudtunk kimutatni antibiotikum adagolást követően, a statisztikai számítások alapján ezek a változások nem nevezhetők szignifikánsnak. Tehát egyik antibiotikum sem volt képes szignifikáns változást indukálni sem a standard törzsek, sem a klinikai izolátumok hidrofobicitási értékeiben ($F= 1.429$; $p= 0.324$). Az antibiotikus koncentráció módosító hatását sub-inhibitorikus és supra-inhibitorikus koncentrációk alkalmazásával vizsgáltuk. A statisztikai kiértékelés alapján az antibiotikus koncentráció nem befolyásolta szignifikánsan a sejt felszíni hidrofobicitást ($F= 0.038$; $p= 0.863$). Irodalmi adatok és az előző SAT módszeres eredményeink alapján ismert, hogy az antibiotikum kezelés képes módosítani a bakteriális morfológiát és számos sejt funkciót. Feltehetően azonban a vizsgálatainkban alkalmazott antibiotikumok nem tudtak jelentős változást indukálni azon sejt felszíni struktúrákban, amelyek szerepet játszanak a mikrobák szénhidrogénekhez való kapcsolódásában, ebből adódóan nem tudtunk a MATH módszerrel szignifikáns változást detektálni antibiotikus kezelés hatására.

Összehasonlítva a sejt felszíni hidrofobicitás meghatározására használt kisózási módszer és a szénhidrogénekhez történő adhézis módszer eredményeit, nem tudtunk korrelációt kimutatni a két technikával kapott adatok között. Hasonló eredményeket publikáltak 1999-ben Ocana és mtsai is. Ezeket a különbségeket azzal magyarázzák, hogy nem ugyanazon sejt felszíni struktúrák felelősek a két különböző technikával kapott eredményekért.

4. Külső membrán fehérjék analízise kapilláris elektroforézissel

4.1. Anyag és módszer

Ezen kísérlet sorozatunkban az ortopédiai mintákból izolált *Pseudomonas* törzsek, valamint a standard *P. aeruginosa* törzs külső membrán fehérjeit (OMP) kívántuk kipreparálni, majd a kapilláris elektroforézis technika felhasználásával összehasonlítani ezeknek a törzseknek az OMP összetételét, a major fehérjék molekulatömegét és mennyiségét. Elemezni kívántuk továbbá, hogy a supra-inhibitorikus koncentrációjú antibiotikumok képesek-e szignifikáns változásokat előidézni a *Pseudomonas* törzsekre jellemző külső membrán protein profilokban.

4.1.1. Külső membrán fehérjék (OMP) preparálása

Kísérlet sorozatunkban a standard *P. aeruginosa* NIH Hungary 170000 törzs és 5 klinikai *Pseudomonas* izolátum (KT 2, KT 7, KT 25 Ps., KT 28, KT 39) külső membrán fehérjeit preparáltuk ki és vizsgáltuk a kapilláris elektroforézis technika felhasználásával.

A baktériumokat 2000 ml táptalajban tenyésztettük (1.667 % peptone, 0.11 % Na_2HPO_4 , 0.389 % glükóz, 0.195 % hús kivonat, 0.023 % MgCl_2 , pH=7.2), majd centrifugálással gyűjtöttük össze. A bakteriális sejtek plazmolízisét a sejt üledék reszuszpendálásával érték el (25 ml 0.75 M sucrose/10 mM Tris, pH=7.5). A *Pseudomonas* sejtek peptidoglikán rétegét lizozim kezeléssel emésztettük (2.5 mg lizozim 2 percig 4°C-on). Ezután 50 ml 1.5 mM EDTA, pH=7.5 oldatot adagoltunk lassan (kb 10 perc alatt) a szuszpenzióhoz, amely egyrészt hígította azt, másrészt az eredetileg pálcá alakú baktériumokat gömb alakú spheroplastokká alakította. A spheroplastok lízisét ultrahangos kezeléssel idéztük elő (400 W, 4 x 2 perc). A fel nem tört sejteket centrifugálással távolítottuk el. A lizátumok membrán frakcióit ultracentrifugálással gyűjtöttük össze (100.000 g, 2 x 1 h, 4°C). A belső és külső membrán elválasztására sucrose gradiens ultracentrifugálást alkalmaztunk. Az üledéket 25 % (w/w) sucrose/5mM EDTA, pH=7.5 oldatban reszuszpendáltuk, és 30-55 % (w/w) sucrose/5 mM EDTA, pH=7.5 lépcsős gradiens tetejére rétegeztük. A gradiens ultracentrifugálást 100.000 g-vel, 21 órán át, 4°C-on végeztük. A centrifugálás után a külső és belső membrán turbid csík formájában volt látható. A külső membrán frakcióit összegyűjtöttük, ultracentrifugálással mostuk, majd 500 μL mintapufferben (0.125 M Tris-HCl, pH=6.8, 4 % SDS, 10 % β -mercaptoethanol) reszuszpendáltuk.

Az antibiotikumok OMP összetételre gyakorolt hatásának elemzéséhez a baktérium tenyészeteket 2 x MIC koncentrációjú antibiotikus kezelésnek vetettük alá 60 percen keresztül, majd az OMP-k preparálását az előbb leírt módon végeztük.

4.1.2. Kapilláris elektroforézis

A baktériumok külső membrán fehérje összetételének vizsgálatára egy új és modern módszert, a kapilláris elektroforézist alkalmaztuk. Ez egy rendkívül gyors módszer, amely percekben belül szolgáltat adatokat a fehérje összetételről, mennyiségükről, molekulasúlyukról. Ez a módszer lehetővé teszi az SDS-PAGE-nál alkalmazott időigényes festési, gélzáritási lépések elhagyását a direkt UV detektálás segítségével. További előnyei a módszernek a kis minta-, és puffer igény (nL-es nagyságrend), és az automatizálhatóság. Az adatok kvantitatívak, számítógépes rendszer segítségével azonnal kiértékelhetők és tárolhatók.

A kapilláris elektroforetikus vizsgálatok során az ún. dinamikus sieving kapilláris elektroforézis technikát alkalmaztuk. Ez a módszer lehetővé tette a fehérjék molekulasúly alapján történő elválasztását. Háttér pufferként a BioRad kereskedelemben is kapható CE-SDS protein futtató puffert alkalmaztuk, melyben egy hidrofíli polimer 14000 és 200000 Da molekulasúly tartományban biztosít szűrő effektust, és a fehérjék molekulasúly alapján történő elválasztását.

A méréseket BioFocus 3000 rendszerben végeztük, 24 cm hosszú, 50 µm belső átmérőjű ömlesztett szilika kapillárisokban. Az elválasztás konstans feszültség mellett történt (15 kV), a hőmérsékletet 20°C-on stabilizáltuk. A mintákat hidrodinamikusan injektáltuk, 50 psi x sec nyomással. A kapillárist minden futtatás között mostuk, (0.1 M NaOH, 0.1 NaCl, deionizált víz) ilyen módon eltávolítottuk a polimeres futtató oldatot. UV detektálást végeztünk 220, 254 és 280 nm-en. Az adatok feldolgozása és tárolása számítógépes rendszerrel történt.

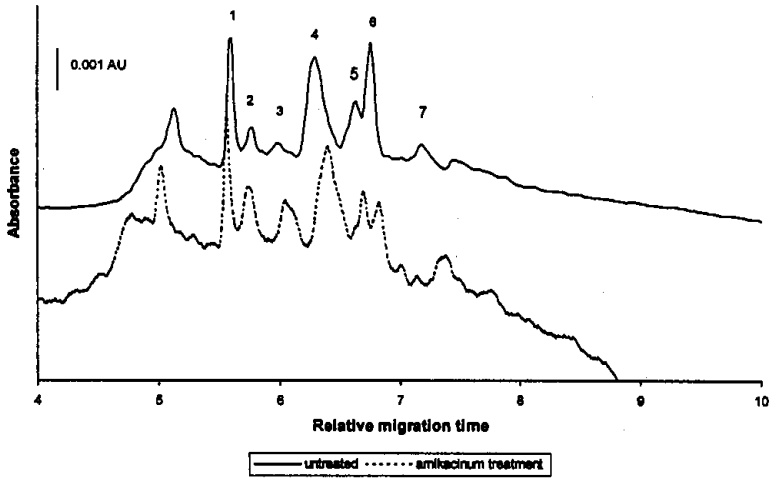
Minden futtatásnál egy belső standardot (benzoesav) alkalmaztunk a fehérjék relatív migrációs sebességének meghatározásához. A fehérjék molekulasúlyának meghatározásához a Pharmacia alacsony molekulasúlyú kalibrációs kitjét használtuk (α-lactalbumin, 14.4 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa; carbonic anhidráz, 30.0 kDa; ovalbumin, 43 kDa; albumin, 67 kDa; phosphorilase b, 94 kDa). A fehérjék mennyiségének meghatározásához a csúcsok alatti területek %-os arányát határoztuk meg a Biofocus Integrator Program segítségével.

4.2. Eredmények

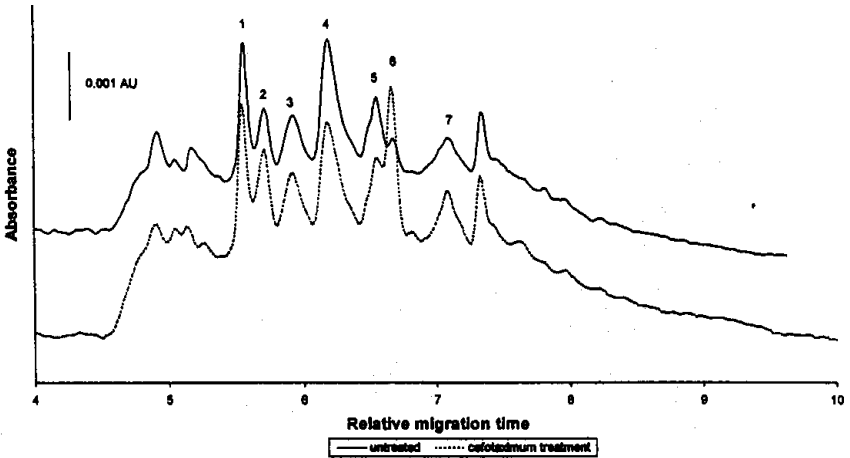
A *Pseudomonas* törzsek kapilláris elektroforetikus külső membrán fehérje mintázata jellemző volt a genusra és jelentősen különbözött (a domináló fehérjék számát és molekulatömegét tekintve) más fajok (pl. *Salmonella minnesota*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Proteus penneri*) profiljaitól. A kapott mintázatok reprodukálhatóak voltak. A standard törzs és az öt klinikai *Pseudomonas* izolátum OMP összetétele hasonlított egymáshoz. Minden profilt hét major fehérje jelenlétével lehetett jellemezni, melyek molekulatömege 22,6, 25,8, 29,1, 34,4, 37,6, 38,8 és 46,6 kDa volt. Ezeket a major proteineket minden profilban detektálni lehetett, de fehérjék mennyisége és relatív aránya különbözött az egyes törzsek elektroferogramjain. Pl. a 38,8 kDa fehérje nagy mennyiségben volt jelen a KT 2 és kis mennyiségben a KT 7 törzs profiljában, míg a 29,1 kDa protein a KT 2 mintázatában nagy mennyiségben volt jelen és a KT 25 mintázatában alacsony mennyiségben a többi *Pseudomonas* OMP összetételéhez viszonyítva.

Az antibiotikus kezelés képes módosítani a baktériumok OMP profilját. A kísérlet sorozatunkban használt három antibiotikum (cefotaxim, klavulánsavval kombinált amoxicillin, amikacin) képes volt befolyásolni az OMP összetételét. Szignifikáns változást három esetben tudtunk kimutatni (a fehérjék relatív mennyiségében bekövetkező változás meghaladta a standard deviáció háromszorosát), de kisebb eltérések több esetben is detektálhatóak voltak. A 2. ábrán két esetet demonstrálunk, ahol szignifikáns változás volt kimutatható antibiotikus kezelést követően. A KT 2 törzs mintázatában (2a ábra) a 38,8 kDa protein mennyisége csökkent szignifikánsan (20 %-ról 6 %-ra) amikacin kezelés hatására. A KT 7 (2b ábra) és a KT 28 törzsek OMP profilja szintén szignifikáns változást mutatott: cefotaxim adagolást követően a 38,8 kDa protein mennyisége növekedett (KT 7 törzs esetében 2 %-ról 16 %-ra, míg KT 28 törzs profiljában 12 %-ról 28 %-ra). A bemutatott szignifikáns változások igen nagy jelentőségűek lehetnek, hiszen az OMP összetétel befolyásolhatja a baktérium és a gazdaszervezet receptorai között kialakuló kölcsönhatásokat, ezáltal az adhézió folyamata (ebben az esetben ennek második vagy irreverzibilis fázisa) megváltozhat az antibiotikum kezelés hatására.

2. (a) ábra KT 2



2. (b) ábra KT 7



2. ábra Az ábrákon két *Pseudomonas* törzs (2.a. KT 2, 2.b. KT 7) külső membrán fehérje kapilláris elektroferogramja látható. Folyamatos vonallal látható a kezeletlen minta, szaggatott vonallal a fehérje profil antibiotikus kezelést (KT 2 – amikacin, KT 7 – cefotaxim) követően.

5. Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek polyethylén vápán történő megtapadásának vizsgálata.

5.1. Anyag és módszer

Munkánk utolsó kísérlet sorozatában azt kívántuk vizsgálni, hogy az ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek közül melyek tapadnak meg legjobban a csípő protézis beültetéskor használt polyethylén vápán, különbözik-e ezen megtapadási képességük a standard baktérium törzsek megtapadásától. Vizsgáltuk azt, hogy az antibiotikum hatás hogy módosítja ezt a megtapadási képességet. Függe-e a változás az antibiotikum típusától, illetve az alkalmazott antibiotikum koncentrációjától?

Kísérlet sorozatunkhoz 2-2 ortopédiai mintából izolált, valamint 1-1 standard *S. aureus*, koaguláz-negatív *Staphylococcus* és *P. aeruginosa* törzset használtunk.

A módszer amit kísérlet sorozatunk során követtünk a következő volt:

- A baktérium törzseket 30 ml 0,25% dextrózt tartalmazó PBS oldatban tenyésztettük 24 óráig 37° C-on.
- Ezt követően a baktériumokat centrifugálással gyűjtöttük össze, melyet 15 percig, 4° C-on, 4500 g-vel végeztünk.
- Az átlagos koncentrációt spektrofotométer segítségével állítottuk be.
- Ezt követően a baktérium szuszpenzióba helyeztük az UHMWPE polyethylén acetábulum darabokat, 37° C-on, 2 órára.
- Az acetábulum darabok eltávolítását követően azokat 3 alkalommal mostuk.
- 25 ml, 0,25% dextrózt tartalmazó PBS oldatba helyezve a lemosott acetábulum darabokat, azokat UH-os kezelésnek vetettük alá 1 percig, 125 Watt teljesítménnyel.
- Az oldatból 1-1 ml-t eltávolítva, hígítási sor után, melyhez fiziológiás só oldatot használtunk, 10 µl-t kivéve azt normál agar táptalajra leoltottuk.
- Ezt 24 órán át 37° C-on inkubáltuk.
- A bakteriális megtapadás kiszámítására az 1 cm² területen megjelent telepképzők számát használtuk fel.

Ezen módszert alkalmaztuk antibiotikum kezelés nélkül, majd antibiotikus kezelést követően is. Vizsgálatainkhoz 4féle antibiotikumot használtunk (cefuroxim, cefotaxim, amoxicillin+klavulánsav, amikacin) sub-inhíbitorikus (0.5 x MIC) és suprainhíbitorikus koncentrációban (2 x MIC).

Eredményeink értékelésére itt is az egy- illetve többutas varianciaanalízist (ANOVA ill. TWANOVA) használtuk.

5.2. Eredmények

Munkánk során azt találtuk, hogy az ortopédiai szempontból „fakultatív patogénnek” tekintett, de biofilm képzésre hajlamos koaguláz-negatív *Staphylococcus* /CNS/ törzsek mutatták a legnagyobb megtapadási képességet a polyethylén vápa darabokhoz. Őket követték, szignifikánsan alacsonyabb értékekkel a *S. aureus* és a legalacsonyabb megtapadási képességgel a *P. aeruginosa* törzsek ($p < 0,001$). Ezzel szemben nem észleltünk különbséget a standard baktérium törzsek és az ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek megtapadási képességében.

Az antibiotikumok megtapadási képességet befolyásoló hatását vizsgálva azt találtuk, hogy az antibiotikumok alkalmazása esetén a baktérium törzsek polyethylén vápán történő megtapadása szignifikánsan csökkent ($p < 0,001$). Érdekes módon azonban nem találtunk lényeges különbséget az egyes antibiotikumok között a megtapadást befolyásoló hatásban ($p < 0,190$), így mind a 4 általunk vizsgált antibiotikum (cefuroxim, cefotaxim, amoxicillin+klavulánsav, amikacin) hasonló mértékben csökkentette a baktérium törzsek megtapadási képességét, mely legkevésbé a *P. aeruginosa* törzseknél volt észlelhető. Ezzel szemben szignifikáns összefüggést láttunk a baktériumok megtapadási képessége és az alkalmazott antibiotikum koncentrációk között ($p = 0,005$). Így a supra-inhibitorikus ($2 \times \text{MIC}$) koncentráció szignifikánsan csökkentette a vizsgált baktérium törzsek polyethylén vápán történő megtapadását a sub-inhibitorikus ($0,5 \times \text{MIC}$) antibiotikum koncentrációhoz képest.

Új eredmények

1. Meghatároztuk a klinikai gyakorlatban, fertőzések esetén leggyakrabban használt labor paraméterek (We, Fvs, CRP) „normál” értékeit nagyüzleti endoprotézis beültetést követően. A vizsgált paraméterek közül a CRP érték bizonyult a leginformatívabbnak a közvetlen posztoperatív szakban, a korai sebfertőzések diagnózisának alátámasztására.
2. A baktériumok sejt felszíni hidrofobicitásának elemzésére két különböző módszert, a SAT és MATH technikákat alkalmaztuk. A két metodikával hidrofobicitási eredmények között korrelációt nem tudtunk kimutatni.
3. Egyik módszerrel sem volt detektálható szignifikáns különbség a standard törzsek és a klinikai izolátumok sejt felszíni hidrofobicitását tekintve.
4. A SAT technikával az esetek kb. 40 %-ban tudtunk szignifikáns változást kimutatni a bakteriális hidrofobicitásban antibiotikus kezelés hatására. A supra-inhibitorikus koncentráció gyakoribb és nagyobb mértékű változást idézett elő.
5. Ezzel szemben a MATH módszerrel az antibiotikus kezelés után nem tudunk szignifikáns változásokat igazolni. Ugyanakkor az egyes bakteriális speciesek hidrofobicitása szignifikáns eltéréseket mutatott. A MATH technika során alkalmazott különböző oldószerek nem befolyásolták szignifikánsan a baktérium sejtekre jellemző hidrofobicitási értékeket.
6. Kapilláris elektroforézis technikával meghatároztuk az otropédiai mintákból izolált és a standardként alkalmazott *Pseudomonas* törzsekre jellemző külső membrán fehérje profilokat. Supra-inhibitorikus antibiotikus kezelés hatására több esetben tudtunk szignifikáns változást demonstrálni az elektroferogramokban.
7. A három különböző bakteriális speciést vizsgálva a fakultatív patogénként kezelt koaguláz-negatív *Staphylococcusok* mutatták a legnagyobb fokú megtapadási képességet a totál endoprotéziseknél használt polietilén acetabulum komponensen. Szignifikánsan alacsonyabb adhezív képességgel voltak jellemezhetőek a *S. aureus* törzsek, míg a legkisebb fokú tapadási képességet a *Pseudomonas* törzsek mutatták.
8. A baktériumok megtapadási képessége antibiotikumok adagolására szignifikánsan csökkent, függetlenül az antibiotikum típusától. Annak ellenére, hogy az egyes antibiotikumok hatása között - meglepő módon - szignifikáns különbség nem volt kimutatható, az antibiotikum koncentráció változásai viszont szignifikánsan befolyásolták a tapadási képességet.

-)
9. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a bakteriális sejt felszíni hidrofobicitás, külső membrán fehérje összetétel, és az adhezív képesség összefüggésben állnak egymással. Mindezen tényezőknek igen jelentős szerepük van a fertőzési folyamat kialakulásában, de meg kell említenünk, hogy további más faktorok is fontos szerepet játszanak a baktériumok megtapadásában, a fertőzési folyamatban. Az antibiotikus kezelés képes volt módosítani a külső membrán fehérje profilt, csökkenteni a hidrofobicitást és a megtapadási képességet. Mindez a klinikai gyakorlatban a pre- és postoperatív antibiotikus kezelés jelentőségére hívja fel a figyelmet. A lehető legkisebb traumatizációval járó műtéti technika, jó minőségű, modern implantátumok alkalmazása a sterilitás szabályainak messzemenő betartása, illetve a műtéti eljárások során alkalmazott profilaktikus antibiotikumok alkalmazása csökkentheti a műtéti fertőzések számát. A sajnálatosan mégis kialakuló sebfertőzések esetén a kórokozók kitenyésztésével antibiotikum érzékenységen alapuló terápiát kell folytatni megfelelő dózisban és megfelelő ideig, hogy az implantátumokhoz biofilmben kötődő mikroorganizmusokat is elpusztítsuk, így csökkentjük a sebfertőzéseket követő nagyizületi endoprotézis cserék, illetve protézis eltávolítások számát.

Publikációs jegyzék

Az értekezés tárgyköréből megjelent publikációk és idézhető absztraktok jegyzéke

1. Kustos T., Kustos I., Gonda E., Kocsis B., Szabó Gy., Kilár F.:
Capillary electrophoresis study of outer membrane proteins of *Pseudomonas* strains upon antibiotic treatment
J. Chromatography A 979: 277-284, 2002 **Impact factor : 2.793**
2. Kustos T., Kustos I., Kilár F., Rappai G., Kocsis B.:
Effect of antibiotics on cell surface hydrophobicity of bacteria causing orthopaedic wound infections
Chemotherapy (Közlésre elfogadva) **Impact factor: 1.129**
3. Kustos T., Szabó L., Than P.:
Veränderungen der Infektions-Laborparameter nach Endoprothesen-Implantationen
Zeitschrift für Orthopädie (Közlésre leadva)
4. Kustos I., Kustos T., Kilár F., Rappai G., Kocsis B.:
Changes in bacterial hydrophobicity of orthopedic isolates under antibiotic effect determined by the microbial adhesion to hydrocarbon method
Journal of Applied Microbiology (Közlésre leadva)

Absztraktok:

1. Kustos T., Kustos I., Kocsis B., Szabó Gy.:
Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek hidrofóbicitásának elemzése
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet
45: Suppl. 1, pp. 39, 2002 **Abstract**
2. Than P., Kustos T.:
Significance of postoperative fever and changes in inflammatory laboratory parameters after total hip replacement
4th CEOC, Book of Abstracts 93, 2002 **Abstract**
3. Kustos T., Kustos I., Bálint L., Kocsis B.:
Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek polietilén vápán történő megtapadásának mikrobiológiai elemzése
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet
46: Supplementum 1, 43, 2003 **Abstract**

Az értekezés tárgyköréből tartott előadások jegyzéke:

1. **Kustos T., Kustos I., Kocsis B., Szabó Gy.:**
Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek hidrofóbicitásának elemzése
Magyar Ortopéd Társaság (MOT) 45. Kongresszusa, Pécs 2002
2. **Than P., Kustos T.**
Significance of postoperative fever and changes in inflammatory laboratory
parameters after total hip replacement
4th CEOC Dubrovnik, Croatia 2002
3. **Kustos T., Kustos I., Szabó Gy., Kocsis B.**
Analysis of hydrophobicity in bacterial strains isolated from orthopedic
samples.
SICOT/SIROT 2002, XXII World Congress, San Diego, USA 2002
4. **Kustos T., Kustos I., Bálint L., Kocsis B.**
Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek polyethylén vápán történő
megtapadásának mikrobiológiai elemzése
Magyar Ortopéd Társaság (MOT) 46. Kongresszusa, Budapest 2003

A szerző összes publikációjának jegyzéke:

1. Moser T., Kustos T., Schmidt B.:
Arthroscopia a gyermekorthopaediában
Sportorvosi Szemle (Hungarian Review of Sports Medicine)
33: 48-52, 1992
2. Szomor Z., Than P., Kustos T.:
A chondromalacia patellae gyakorisága serdülőkorú sportolóknál
Hungarian Orthopaedic Association, Zinner Nándor pályamunka, 1992
3. Szomor Z., Than P., Kustos T.:
A chondromalacia patellae műtéti kezelésének eredményei serdülőkorú sportolóknál
Sportorvosi Szemle (Hungarian Review of Sports Medicine)
34: 47-53, 1993
4. Kustos T., Magdics M.:
Kétoldali torticollis
Orvosi Hetilap 134: 2817-2820, 1993
5. Kustos T., Than P., Szomor Z.:
Incidence of chondromalacia patellae in adolescent athletes
Orthopaedics International Edition 3: 433-436, 1995 Impact faktor: 0.162
6. Than P., Bálint L., Kustos T.:
Osteochondroma ritka localisatioja: a scapula
Orvosi Hetilap 136: 2047-2049, 1995
7. Than P., Bálint L., Kustos T.:
Ergebnisse der operative Behandlung bei Scapula Saltans und bei Exostosen des Schulterbalttes
Orthopadische Praxis 31: 439-442, 1995
8. Szomor Z., Than P., Kustos T.:
Az előlso keresztcszalag szakadásának kezelési eredményei klinikánkon
(Results of the treatment of anterior cruciate ligament tear)
Sportorvosi Szemle (Hungarian Review of Sports Medicine)
37: 41-52, 1996
9. Kustos T., Szabó Gy., Than P.:
Részleges többszintű percutan achillotenotomia
Magyar Traumatologia, Ortopedia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet
40: 205-209, 1997
10. Kránicz J., Than P., Kustos T.:
Long-term results of the operative treatment of clubfoot:
A representative study
Orthopaedics 21: 669-674, 1998 Impact faktor: 0.287
11. Szabó G., Kustos T., Grand F., Mester S.:
Bone Substitution of Benign Bone Defects in Children
Orthopaedic Update (India) 8: 236-238, 1998
12. Than P., de Jonge T., Szabó G., Kustos T., Gomori E.:
Multiple Familial Occurrence of Ochronotic Arthropathy
Orthopaedics 21: 590-592, 1998 Impact faktor: 0.287
13. Szabó G., Kustos T., Jayyab Z.A.:
Comparative Analysis of Two Techniques for Achilles Tendon Lengthening in Cerebral Palsy
Emirates Med. J. 18: 41-43, 2000
14. Szabó Gy., Lovász Gy., Kustos T., Bener A.:
A prospective comparative analysis of mobility in osteoarthritic knees:
Does lifestyle have an influence?
J. Bone Joint Surgery (Br) 82 - B.: 1167-1169, 2000 Impact faktor: 1.612
15. Kustos T., Szabó L., Dávid M.:
Fragminnal szerzett tapasztalataink arthroplastikán átesett ortopédiai betegek prolongált profilaxisában
Magyar Traumatologia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet
44: 28-38, 2001

16. Kustos T., Kustos I., Gonda E., Kocsis B., Szabó Gy., Kilár F.:
Capillary electrophoresis study of outer membrane proteins of *Pseudomonas* strains upon antibiotic treatment
J. Chromatography A 979: 277-284, 2002 Impact factor : 2.793
17. Kustos T., Beliyei Á., Koós Z., Horváth Á.:
Mélyfagyaszott BTB allografttal végzett primer LCA plasztikaink középtávú eredményei
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet
46: 47-54, 2003
18. Kustos T., Kustos I., Kilár F., Rappai G., Kocsis B.:
Effect of antibiotics on cell surface hydrophobicity of bacteria causing orthopaedic wound infections
Chemotherapy (Közlésre elfogadva) Impact factor: 1.129
19. Kustos T., Szabó I., Than P.:
Veränderungen der Infektions-Laborparameter nach Endoprothesen-Implantationen
Zeitschrift für Orthopädie (Közlésre leadva)
20. Kustos T., Bálint L., Than P., Bárdos T.:
Primary Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using Patellar Bone Tendon Autograft or Allograft: a Comparative Study
Orthopaedics (Közlésre leadva)
21. Kustos I., Kustos T., Kilár F., Rappai G., Kocsis B.:
Changes in bacterial hydrophobicity of orthopedic isolates under antibiotic effect determined by the microbial adhesion to hydrocarbon method
Journal of Applied Microbiology (Közlésre leadva)

1. Bátai I., Gáspár T., Kustos T.:
Laryngealis maszk alkalmazása low flow anaesthesiával.
A Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság Nemzeti Kongresszusa, Siófok 1996
Abstract 3.01.
2. Kustos T., Szabó Gy., Lovász Gy.:
Prospective comparative analysis of mobility in osteoarthritic knees:
Does lifestyle have an influence?
J. Bone Joint Surgery (Br.) 83-B.: Suppl. II.:
pp. 133, 2001
Abstract
Impact factor: 1.612
3. Kustos T., Than P., Koós Z., Szabó Gy.:
Short term results of anterior cruciate ligament plasty with deep frozen allogenic BTB graft
13th SICOT Trainees Meeting, Book of Abstracts 226, 2002
Abstract
4. Kustos T., Than P., Koós Z., Szabó Gy., Bálint L.:
Primary anterior cruciate ligament plasty with allogenic bone - patellar tendon - bone graft
4th CEOC Book of Abstracts 115, 2002
Abstract
5. Than P., Kustos T.:
Significance of postoperative fever and changes in inflammatory laboratory parameters after total hip replacement
4th CEOC, Book of Abstracts 93, 2002
Abstract
6. Szabó Gy., Fónay V., Kustos T., De Jonge T., Illés T.:
Mélyfagyasztásos élő csontbank, 10 éves tapasztalatok
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet
45: Suppl. I, pp. 60, 2002
Abstract
7. Kustos T., Kustos I., Kocsis B., Szabó Gy.:
Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek hidrofóbicitásának elemzése
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet
45: Suppl. I, pp. 39, 2002
Abstract
8. Kustos T., Than P., Szabó Gy.:
A csontbank szerepe a sportsebészetben
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet
45: Suppl. I, pp. 40, 2002
Abstract

9. **Kustos T., Bálint L., Bárdos T.:**
Comparative analysis of primary anterior cruciate ligament plasty with allogenic and autogenic bone-patellar tendon – bone graft
6th EFORT Congress, Abstract Book 50, 2003 Abstract
10. **Kustos T., Kustos I., Bálint L., Kocsis B.:**
Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek polietilén vápán történő megtapadásának mikrobiológiai elemzése
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet
46: Supplementum 1, 43, 2003 Abstract
11. **Bálint L., Kustos T., Péterfy Z., Szabó Gy.:**
Csontcementből történő Gentamycin emissio in vivo detektálása évekkel nagyízületi endoprothesis beültetést követően
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet
46: Supplementum 1, 21, 2003 Abstract
12. **Kustos T., Bélyei Á., Vermes Cs.:**
A spasztikus betegeknek alkalmazott percutan és nyílt Achillotenotomiák eredményeinek hosszú távú összehasonlító vizsgálata
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet
46: Supplementum 1, 44, 2003 Abstract

Kumulatív impact factor: 6.27